

Диагностическая тест-система «Иерсиниоз-ИФА- IgM» – набор реагентов для выявления антител класса М к возбудителям кишечного иерсиниоза (*Yersinia enterocolitica*) и псевдотуберкулеза (*Yersinia pseudotuberculosis*) в сыворотке (плазме) человека. Комплект набора рассчитан на одновременное исследование 96 образцов, включая контроли.

В наборе используется композиция рекомбинантных белков иерсиний, сорбированных на поверхности стрипов.

**Таблица 1. Состав набора:**

Маркировка	Компонент	Статус	Цвет раствора	Фасовка
Иммуно-сорбент	Иммуносорбент - микропланшет с сорбированной в лунках смесью антигенов.	Готов к использованию	---	12x8
К+	«К+» - положительный контрольный образец	Готов к использованию	красный	1x 1,2 мл
К-	«К-» - отрицательный контрольный образец	Готов к использованию	зеленый	2x 1,2 мл
БРС	Буфер для разведения сывороток.	Готов к использованию	красный	1x 10,0 мл
БИС	Буфер для инкубации сывороток.	Готов к использованию	синий	1 x 10,0 мл
ФСБ-Т	20 x концентрат фосфатного солевого буфера с твином.	Требуется подготовки	бесцветный	2 x 20,0 мл
РК IgM	Раствор конъюгата с пероксидазой хрена.	Готов к использованию	желтый	1 x 12,0 мл
ТМБ	Раствор хромогена (3, 3', 5, 5' – тетраметилбензидина)..	Требуется подготовки	бесцветный	1 x 7,0 мл
ЦФБ	Цитрат-фосфатный буфер	Требуется подготовки	бесцветный	1 x 7,0 мл
Стоп-реагент	2н раствор соляной кислоты.	Готов к использованию	бесцветный	1 x 12,0 мл
---	Пленка для инкубации планшетов	---	---	1 шт.
Емкости для жидких компонентов	Емкости для жидких компонентов	---	---	2 шт.
---	Инструкция по применению	---	---	1 шт.

**Состав набора (подробный)**

- «Иммуносорбент» – 96-луночный разборный планшет для иммунологических реакций, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов иерсиний. Готов к использованию – 1 шт.;

- «К+» – положительный контрольный образец – сыворотка крови человека, в разведении 1:100 содержащая антитела класса М к антигенам иерсиний, инактивированная, прозрачная жидкость красного цвета, допускается опалесценция. Готов к использованию – 1 флакон (1,2мл);

- «К-» – отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека в разведении 1:100, не содержащая антител к антигенам иерсиний, инактивированная, прозрачная жидкость зеленого цвета, допускается опалесценция. Готов к использованию – 2 флакона (по 1,2 мл); примечание: Все образцы сывороток крови человека входящие в состав «К+» и «К-» тестированы на отсутствие антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, антигена р24 ВИЧ-1, антител

к гепатиту С, антител к HBsAg тест-системами, сертифицированными и разрешенными к применению на территории РФ.

- «БРС» – буфер для разведения сывороток, прозрачная жидкость красного цвета. Готов к использованию – 1 флакон (10,0 мл);
- «БИС» – буфер для инкубации сывороток, прозрачная жидкость синего цвета. Готов к использованию – 1 флакон (10,0 мл);
- «ФСБ-Т» (20 х концентрат) – прозрачная пенящаяся жидкость, допускается опалесценция и выпадение кристаллического осадка белого цвета, растворяющегося при температуре +37°C в течение 30 мин, требует предварительного разведения (см. Приготовление реагентов) – 2 флакона (по 20,0 мл);
- «РК» – раствор конъюгата, моноклональные мышинные антитела к IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена, прозрачная жидкость желтого цвета. Готов к использованию – 1 флакон (12,0 мл);
- «ТМБ» – 3, 3', 5, 5' - тетраметилбензидин (ТМБ), прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость, требует приготовления – 1 флакон (7,0 мл);
- «ЦФБ» – цитрат-фосфатный буфер, прозрачная, бесцветная жидкость, требует приготовления – 1 флакон (7,0 мл);
- «Стоп-реагент» (2н соляная кислота) – прозрачная бесцветная жидкость. Готов к использованию – 1 флакон (12,0 мл).

### **Меры предосторожности**

Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, в состав которого входит соляная кислота, в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Стоп-реагент, содержащий соляную кислоту, действует на кожу и слизистые, вызывая раздражение и ожоги, поэтому в случае попадания на кожные или слизистые покровы его следует немедленно и тщательно смыть большим количеством проточной воды.

При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

Работая с набором, следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатитов и другие возбудители вирусных и других гемотрансмиссивных инфекций.

При утилизации контрольных сывороток и тестируемых образцов необходимо руководствоваться официально утвержденными правилами работы с инфекционным материалом.

! При проведении анализа категорически запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

### **Оборудование, реагенты и материалы:**

- Фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм.
- Автоматический промыватель планшетов (вошер).
- Термостат суховоздушный, поддерживающий температуру +37°C, или планшетный шейкер-термостат, обеспечивающий температуру +37°C.
- Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 - 200 мкл и 200 – 1000 мкл.

- Пипетка полуавтоматическая многоканальная с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50-300 мкл.
- Таймер.
- Бумага фильтровальная.
- Перчатки резиновые.
- Вода дистиллированная.
- Мерные емкости (0,5 л).
- Дистиллированная вода.
- Этиловый спирт, хлорамин или перекись водорода для дезинфекции.

### **Анализируемые образцы**

Для анализа используют образцы сыворотки или плазмы крови человека, подготовленные стандартным образом.

! Для исключения ложных результатов исследуемые образцы сывороток хранить при температуре от +2 °С до +8 °С не более 10 суток. При необходимости возможно длительное хранение при температуре минус 20°С. Следует избегать многократного замораживания-оттаивания. После размораживания пробы тщательно перемешивают, осадок отделяют центрифугированием. Образцы сыворотки с выраженным гемолизом, гиперлипидемией и бактериальным проростом тестированию не подлежат.

### **Проведение иммуноферментного анализа**

#### **Подготовка к анализу**

Выдержать все компоненты набора и анализируемые образцы при комнатной температуре (+18 ...+25 °С) 30 мин.

Установить в рамке планшета необходимое количество стрипов.

*Неиспользованные стрипы хранить только в герметично закрытом пакете при температуре от +2°С до +8°С не более 1 мес. с момента вскрытия пакета «Иммуносорбент».*

#### **Приготовление реагентов**

##### **Рабочий раствор ФСБ-Т**

Содержимое флакона «ФСБ-Т» (20мл) перенести в мерный цилиндр и довести объем раствора до 400 мл дистиллированной водой. При наличии во флаконе «ФСБ-Т» осадка солей необходимо предварительно прогреть его при температуре (+37±1) °С до полного растворения осадка.

Хранение: рабочий раствор ФСБ-Т хранить не более 1 месяца при температуре от +2 °С до +8 °С.

##### **Предварительное разведение исследуемых сывороток**

Образцы исследуемых сывороток разводят 1:10 в «БРС». Для этого смешивают 10 мкл каждой сыворотки с 90 мкл «БРС»

Хранение: разведенные образцы исследуемых сывороток хранению не подлежат.

##### **Рабочий раствор субстрата**

Готовится непосредственно перед использованием! В расчете на 1 стрип. 0,5 мл раствора «ЦФБ» смешать с 0,5 мл «ГМБ». Тщательно перемешать. Хранить не более 10 минут при температуре +20-25° С в защищенном от света месте.

##### **Внесение образцов, контролей**

Образцы и контроли вносятся согласно схеме (таб. 2).

В лунки вносятся: А1 (Бланк) – 100мкл «БИС»; В1– - положительный контроль; С1, D1 – отрицательные контрольные образцы. Начиная с лунки Е1 последовательно вносятся исследуемые образцы.

Таблица 2. Схема внесения образцов и контролей:

Стрипы	1			2		
	Лунка	Образец мкл	«БИС» мкл	Лунка	Образец мкл	«БИС» мкл
<b>A</b>	Бланк	---	100	Образец 5	10	90
<b>B</b>	K+	100	-----	Образец 6	10	90
<b>C</b>	K-	100	-----	Образец 7	10	90
<b>D</b>	K-	100	-----	-----	-----	-----
<b>E</b>	Образец 1	10	90	-----	-----	-----
<b>F</b>	Образец 2	10	90	-----	-----	-----
<b>G</b>	Образец 3	10	90	-----	-----	-----
<b>H</b>	Образец 4	10	90	-----	-----	-----

Дублирование образцов позволяет увеличить достоверность получаемых результатов анализа.

#### **Инкубация образцов (1 этап)**

После внесения образцов планшет следует заклеить клейкой лентой и инкубировать 30 мин при  $(+37\pm 1)$  °C на термошейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или 1 час в термостате при температуре  $(+37\pm 1)$  °C.

#### **Промывка**

По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т три раза следующим образом:

- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;
- в каждую лунку внести по 300 мкл промывочного буфера, перемешать в течение 10 секунд на шейкере;
- удалить содержимое лунок в емкость с дезинфицирующим раствором;
- тщательно удалить остатки влаги из планшета постукиванием перевернутой рамки по фильтровальной бумаге.

#### **Инкубация конъюгата (2 этап)**

После промывки и удаления остатков промывочного раствора, в каждую лунку внести по 100 мкл «РК». Планшет закрыть, как описано выше, и инкубировать 30 мин при  $(+37\pm 1)$  °C на шейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или в термостате при температуре  $(+37\pm 1)$  °C.

#### **Промывка**

По окончании инкубации планшет промыть рабочим раствором ФСБ-Т три раза по 300 мкл в каждую лунку (как описано выше)

#### **Инкубация с хромогеном (3 этап)**

Внести в каждую лунку планшета по 100 мкл раствора субстрата. Планшет инкубировать 10 мин при  $(+37\pm 1)$  °C на шейкере при скорости вращения платформы 500 об/мин или в термостате при температуре  $(+37\pm 1)$  °C.

**Остановка реакции (4 этап)**

Реакцию остановить внесением в каждую лунку по 100 мкл Стоп-реагента. Убедиться в полном изменении окраски.

**Таблица 3. Краткая схема ИФА:**

(использовать только после ознакомления с полной инструкцией!)

<b>Внесение образцов</b>	<b>См. таблицу 2</b>		
<b>Инкубация</b>	<b>30 мин.</b>	<b>+37°C</b>	<b>Шейкер 500 об/мин</b>
<b>Промывка</b>	<b>3 раза по 300 мкл ФСБ-Т</b>		
<b>Внесение РК</b>	<b>100 мкл</b>		
<b>Инкубация</b>	<b>30 мин</b>	<b>+37°C</b>	<b>Шейкер 500 об/мин</b>
<b>Промывка</b>	<b>3 раза по 300 мкл ФСБ-Т</b>		
<b>Внесение рабочего раствора хромогена</b>	<b>100 мкл</b>		
<b>Инкубация</b>	<b>10 мин</b>	<b>+37°C</b>	<b>Шейкер 500 об/мин</b>
<b>Остановка реакции</b>	<b>100 мкл «Стоп-реагент»</b>		
<b>Измерение ОП</b>	<b>450 нм/620нм</b>		

**Учет результатов**

Измерение проводят спектрофотометрически при длине волны 450 нм немедленно после внесения Стоп-реагента. Значение референсной длины волны – 620 нм. Нулевой уровень (бланк) устанавливается по воздуху.

устанавливается по воздуху.

Результаты учитывают только в том случае, если:

- в лунке А1 (Бланк) ОП  $\leq 0,15$ ;
- в лунках с «К-» среднее значение ОП  $\leq 0,2$ ;
- в лунке с «К+» значение ОП  $\geq 0,8$ .

Коэффициент серепозитивности (КС) сыворотки рассчитывают по формуле:

$$КС = \frac{\text{ОП исследуемой сыворотки}}{\text{ОП}_{\text{крит}}}$$

где: ОП<sub>крит.</sub> = ОП К- ср + 0,2

Значения ОП контрольного отрицательного образца не должны отличаться от ОП К-ср более чем на 20%. В противном случае необходимо повторить исследование.

**Таблица 4. Качественная интерпретация результатов:**

КС образца < 0,9	<b>Отрицательный результат.</b> Указывает, что тестируемый образец либо не содержит иммуноглобулинов класса М к возбудителям иерсиниозов, либо содержит не детектируемый уровень иммуноглобулинов.
$0,9 \leq \text{КС образца} \leq 1,1$	<b>Сомнительный результат «серая зона».</b> Повторить анализ. Если повторное исследование показало сомнительный результат, рекомендуется провести дополнительное исследование нового образца сыворотки через 4-6 недель.
КС образца >1,1	<b>Положительный результат.</b> Указывает, что тестируемый образец содержит иммуноглобулины класса М к возбудителям иерсиниозов. Величина КС отражает относительную концентрацию специфических иммуноглобулинов.

**Полуколичественная интерпретация результатов анализа**

Для оценки динамики иммунного ответа рекомендуется сравнить значения КС сывороток пациента, собранных с интервалом 1-2 недели.

Ориентировочный титр сыворотки, соответствующий полученному значению КС:

**Таблица 5. Ориентировочный титр сыворотки, соответствующий полученному значению:**

<b>Диапазон КС для IgM</b>	<b>Ориентировочный титр сыворотки</b>
1.1-1.5	1:100
1.5-3.0	1:200
3.0-4.5	1:400
4.5-6.5	1:800
6.5-9.0	1:1600
>9.0	1:3200

**Условия транспортировки и хранения, срок годности**

Транспортировка наборов реагентов должна производиться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от +2 °С до +8 °С. Допустимо транспортирование от +9 до +20 °С не более 7 сут. Замораживание не допускается. Набор реагентов должен храниться в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света месте при температуре от +2 °С до +8 °С. Срок годности набора – 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.